

综述与专论

RNA干扰文库及其在功能基因组学中的应用*

程小星** 蹇锐 邓少丽 蒋静

(第三军医大学微生物学教研室, 重庆 400038)

摘要 随着人类基因组大规模测序的完成, 下一步的挑战是了解每一个基因的功能. RNA 干扰文库为大规模基因功能筛选提供了可能. 虽然用于线虫等模式生物的 RNAi 文库, 已经证明是大规模基因功能筛选的有效方法, 但这些文库不能用于高等动物的细胞. 自 2003 年以来, 用于人的细胞和哺乳动物细胞的 RNAi 文库取得了突破, 相继出现构建已知基因 RNAi 文库和构建随机 RNAi 文库的报道, 并成功地应用于大规模基因功能的筛选. RNAi 文库作为一种简单、高效、大规模、高通量的功能基因组学研究的工具, 将在基因功能研究、发现新的药物靶基因、发现疾病相关基因等方面有广阔的应用前景.

关键词 RNA 干扰, RNAi 文库, 功能基因组学

学科分类号 Q28, Q75, R394

人类基因组大规模测序已经基本完成, 但破解基因组的序列只是一个起点, 目前多数基因的功能还不清楚, 因此基因功能的研究是今后的发展趋势. 传统研究基因功能的最有效技术之一是细胞和小鼠的基因敲除技术. 但该技术存在技术复杂、周期长、费用昂贵等缺点, 极大地限制了它的应用. 应用物理和化学突变技术可以诱导基因的随机突变, 导致细胞或动物表型的缺陷, 直接进行基因功能的筛选. 但由于该方法通常需要两个等位基因同时突变才会出现明显的表型, 成功的机会比较低. 而 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 文库有希望成为一种简单、高效、大规模、高通量的功能基因组学研究的工具.

1 RNAi 及 RNAi 文库

RNA i 是近年来的重大发现, 是动物和植物界普遍存在的一种防御反应. RNAi 被细胞内出现的双链 RNA (dsRNA) 所激活, 可以高度特异地抑制同源基因的表达^[1,2]. 根据目前的研究, RNAi 的可能机制如下: 长片段 dsRNA 在细胞内被 III 型 RNA 酶 Dicer 切成长度大约为 19~23 nt 的小片段干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 由 siRNA 参与构成复合物 RISC (RNA-induced silence complex). siRNA 通过与同源 mRNA 的特异配对, 引导 RISC 特异地降解同源 mRNA, 导致基因表达的抑制. 因此小片段的 siRNA 也可以诱导高效的基因沉默^[1,2].

在线虫, 注射或喂食 dsRNA 能引起特异基因在动物各器官的沉默, 而且该抑制作用可以持续到

第一代的子代动物. 但是在哺乳动物细胞, 通过长片段 dsRNA 直接转染会引起细胞的毒性反应, 基因沉默效果差. 近年来, 陆续有用体外合成的 siRNA, 或用质粒、病毒等载体在细胞内表达 siRNA 达到在细胞和小鼠抑制特定基因表达的报道^[3-7].

RNAi 文库 (RNAi library) 是人工构建的能通过诱导 RNAi 抑制众多不同基因表达的混合文库, 可以用于建立功能缺陷 (loss of function) 的生物或细胞库, 进行表型的筛选. 该技术在线虫的应用最为成功. 在线虫等模式生物的研究中, 应用 RNAi 文库建立随机基因抑制的线虫, 再进行表型的筛选, 已在其胚胎发育等领域取得了重要的发现^[8-10]. 该文库用含方向相对的两个 T7 启动子的载体, 可从一个随机克隆的 cDNA 模板分别转录出长片段的正义和反义 RNA, 形成 dsRNA, 在体内被 Dicer 切割成小片段的 siRNA, 特异地抑制靶基因的表达. 由于细胞外 dsRNA 不能在哺乳动物细胞有效地诱导 RNAi, 另外, 长链 dsRNA (>30nt) 可导致哺乳动物细胞的毒性反应, 出现非特异的细胞生长停滞和凋亡, 上述转录长片段 dsRNA 建立 RNAi 文库的方法不能应用于哺乳动物及其细胞.

*国家自然科学基金(30370603, 30470094)和国家教育部留学回国人员科研启动基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 023-68752241, Fax: 023-68752241

E-mail: xiaoxing@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2004-10-14, 接受日期: 2004-12-07

在哺乳动物细胞基因功能研究中的可行性,为哺乳动物及其细胞大规模功能基因组学的研究提供了一个重要的技术。

已知基因 RNAi 文库存在以下缺陷: a. 不是随机 RNAi 文库, 必须知道靶基因的序列, 细胞基因的覆盖面窄; b. 针对每一个基因必须合成 2 条以上寡核苷酸, 才能确保从中选出干扰效果较好的; c. 需要合成众多的不同 siRNA, 或构建众多的不同载体; d. 所需费用高, 筛选的工作量巨大。

3 哺乳动物细胞随机 RNAi 文库

随机 RNAi 文库 (random RNAi library) 是人工构建的可能针对任何基因的 RNAi 文库。目前已报道的方法有两种, 一是通过化学合成随机 DNA 序列的方法, 二是通过 cDNA 酶切并克隆到载体的方法。随机 RNAi 文库不需要知道靶基因的序列, 因此理论上讲可以构成抑制任何基因表达的干扰文库, 克服已知基因 RNAi 文库细胞基因覆盖面窄的缺陷。该文库同常用的基因表达文库一样, 为不同 siRNA 载体的混合物, 因此易于保存, 显著地减少了筛选的工作量。

化学合成随机 DNA 序列构成随机 RNAi 文库的方法是应用以下原理。在化学合成寡核苷酸时, 如果碱基选为 N, 则 DNA 合成仪在合成 DNA 片段时将随机选择 A、T、G、C 中的任何一种。19~21 nt 的寡核苷酸如果部分或全部选为 N 时, 则形成了众多不同随机序列寡核苷酸的混合物。在进行互补链合成并克隆到双启动子 RNAi 载体 (见图 1 的载体) 后, 就形成了随机 RNAi 文库^[9]。

限制性内切酶 *Mme* I 的特点是在 DNA 识别序列 (TCCGAC) 下游 20~21 bp 处切开 DNA 片段。Luo 等^[20]巧妙地应用 *Mme* I 的独特特性, 设计了将长 cDNA 片段酶切为 20~21 nt 小 DNA 片段, 克隆于 siRNA 表达载体构成随机 RNAi 文库的方案, 称为 SPEED。首先将随机 cDNA 片段与含 *Mme* I 酶切位点发夹结构的 DNA 接头 (linker) 连接, 再用 *Mme* I 消化, 获得 20~21 bp 与接头连接的 cDNA 小片段。将形成的双链 DNA 打开成单链, 合成互补链, 形成方向相对的两个小片段 cDNA 的拷贝, 中间为不配对的形成发夹结构的 DNA 序列。再克隆到反转录病毒载体中, 构成随机 RNAi 文库。利用小鼠胚胎 cDNA 文库, 他们建立了含 3×10^6 克隆、可以抑制众多不同基因的随机 RNAi 文库, 证明该方法的可行性。

Shirane 等^[21]应用同 Luo 等基本相同的思路独立地设计了构建随机 RNAi 文库的方法, 称为 EPRIL。应用鼠源 FL5.12 细胞的 cDNA 文库, 他们建立了随机 RNAi 文库。对 240 个不同克隆的随机测序发现, 215 个克隆含有正确的能表达 siRNA 的 DNA 片段。BLAST 分析显示, 165 个克隆的插入片段与已知基因或 EST 的顺序相吻合, 绝大多数分属不同的基因。这一结果说明, EPRIL 可以用于复杂基因的随机 RNAi 文库的构建。

Sen 等^[22]独立地设计了相似的建库方案, 称为 REGS (restriction enzyme-generated siRNA)。为了测试该技术的效果, 他们检测了对转基因和内源基因的作用。实验证明, 用该技术制备的 RNAi 文库可以有效地抑制 GFP、Oct-3/4 和 MyoD 的表达。他们应用该方案从混合 cDNA 构建了含 4×10^5 克隆的随机 RNAi 文库。

虽然 RNAi 文库的构建和应用还存在一些问题需要克服, 但该技术已经在大规模基因功能筛选和研究中显示出广阔的应用前景。它的成功应用将有望极大地促进基因功能方面的研究。

参 考 文 献

- 1 Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. 2004, *Nature*, **431** (7006): 343~349
- 2 Hannon G J, Rossi J J. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*, 2004, **431** (7006): 371~378
- 3 Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, **411** (6836): 494~498
- 4 Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, **296** (5567): 550~553
- 5 Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 2002, **20** (5): 497~500
- 6 Xia H, Mao Q, Paulson H L, *et al.* siRNA-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nature Biotechnology*, 2002, **20** (10): 1006~1010
- 7 蹇锐, 程小星, 安静, 等. 应用载体介导的 RNAi 技术抑制 Bcl-2 的表达. 第三军医大学学报, 2004, **26** (4): 294~297
Jian R, Cheng X X, An J, *et al.* *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2004, **26** (4): 294~297
- 8 Kamath R S, Fraser A G, Dong Y, *et al.* Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, 2003, **421** (6920): 231~237
- 9 Boutros M, Kiger A A, Armknecht S, *et al.* Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science*, 2004, **303** (5659): 832~835
- 10 Nollen E A A, Garcia S M, van Haften G, *et al.* Genome-wide RNA

- interference screen identifies previously undescribed regulators of polyglutamine aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (17): 6403~6408
- 11 Singer O, Yanai A, Verma I M. Silence of the genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (15): 5313~5314
 - 12 Fraser A. Human genes hit the big screen. *Nature*, 2004, **428** (6981): 375~378
 - 13 Jones S W, de Souza P M, Lindsay M A. siRNA for gene silencing: a route to drug target discovery. *Current Opinion in Pharmacology*, 2004, **4** (3): 522~527
 - 14 Aza-Blanc P, Cooper C L, Wagner K, *et al.* Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening. *Molecular Cell*, 2003, **12** (9): 627~637
 - 15 Berns K, Hijmans E M, Mullenders J, *et al.* A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*, 2004, **428** (6981): 431~437
 - 16 Paddison P J, Silva J M, Conklin D S, *et al.* A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature*, 2004, **428** (6981): 427~431
 - 17 Zheng L, Liu J, Batalov S, *et al.* An approach to genomewide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (1): 135~140
 - 18 Silva J M, Mizuno H, Brady A, *et al.* RNA interference microarrays: high-throughput loss-of-function genetics in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (17): 6548~6552
 - 19 蹇锐, 程小星, 彭涛, 等. U6 和 H1 双启动子载体用于 RNAi 的实验研究. *中国生物工程杂志*, 2004, **24** (11): 26~31
 - Jian R, Cheng X X, Peng T, *et al.* *China Biotechnology*, 2004, **24** (11): 26~31
 - 20 Luo B, Heard A D, Lodish H F. Small interfering RNA production by enzymatic engineering of DNA (SPEED). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (15): 5494~5499
 - 21 Shirane D, Sugao K, Namiki S, *et al.* Enzymatic production of RNAi libraries from cDNAs. *Nature Genetics*, 2004, **36** (2): 190~196
 - 22 Sen G, Wehrman T S, Myers J W, *et al.* Restriction enzyme-generated siRNA (REGS) vectors and libraries. *Nature Genetics*, 2004, **36** (2): 183~189

RNA Interference Library and Its Application in Functional Genomics*

CHENG Xiao-Xing**, JIAN Rui, DENG Shao-Li, JIANG Jing

(Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract With the completion of human genome sequencing, the next challenge is to understand the function of each gene. RNA interference (RNAi) library can be used in large scale loss-of-function and phenotype screening. Although RNAi libraries have been proved to be a powerful tool of functional genetic screening in model organisms such as *Caenorhabditis elegans*, their use in mammalian cells has been hampered by toxic effect induced by long dsRNA. However, since 2003, several RNAi libraries that can be used in mammalian cells have been established and used for functional genetic screening. As a simple, effective, large scale and high-throughput screening technique in functional genomics, RNAi library can be used in functional genetic screening, drug target discovery and validation, disease gene discovery and many other areas.

Key words RNA interference, RNAi library, functional genomics

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30370603, 30470094) and The Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry.

**Corresponding author. Tel: 86-23-68752241, Fax: 86-23-68752241, E-mail: xiaoxing@mail.tmmu.com.cn

Received: October 14, 2004 Accepted: December 7, 2004